Politechnika Łódzka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Łódź, dn. 17-07-2024 r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Gajewskiej
zatytułowanej
„ Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych",

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Zadernowskiej, prof. UWM oraz dr hab. inż. Wioletty Chajęckiej-Wierzchowskiej

w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Dobór i znaczenie tematyki

Podjęta w dysertacji tematyka oceny antybiotykoodporności oraz wpływu stresu środowiskowego na ekspresję czynników wirulencji szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych **jest jak najbardziej aktualna i wpisuje się w nurt badań prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.** Ponadto wnosi do wiedzy z zakresu tej dyscypliny nowe informacje dotyczące przedmiotu badań i może być przydatna podczas monitorowania dróg przenoszenia chorobotwórczych bakterii z *Staphylococcus aureus*, indukcji/wyciszania ekspresji genów odpowiadających za produkcję enterotoksyn, oraz opracowania instrukcji i procedur prewencyjnych w tym zakresie.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona przez p. mgr inż. Joannę Gajewską do oceny rozprawa doktorska zatytułowana **„Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych"** składa się z cyklu 4 publikacji anglojęzycznych poprzedzonych opisem dalej zwanym komentarzem w języku polskim. W opracowaniu znajdujemy również oświadczenia o wkładzie pracy w publikacje samej Doktorantki oraz Współautorów prac. Z oświadczeń jednoznacznie wyłania się wiodąca rola p. mgr inż. Joanny Gajewskiej, która jako swój indywidualny wkład deklaruje: opracowanie koncepcji, przegląd baz danych, analizę statystyczną, interpretację uzyskanych wyników, zebranie i przygotowanie przeglądu literatury, prezentacji wyników i ich przedyskutowaniu na tle danych literaturowych, sformułowanie wniosków, korektę artykułów. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest autorem korespondencyjnym. Publikacje składające się na dysertację doktorską zostały opublikowane w latach 2022-2023 w czasopismach z listy JCR: *Food Control* o współczynniku oddziaływania Impact Factor (IF) 6,6652; *Molecules* o IF 4,6; *International Dairy Journal* o IF 3,6 oraz *Pathogens* o IF 3,7. Wymienione czasopisma zostały przypisane do dyscypliny technologia żywności i żywienia i są wiodącymi czasopismami w tematyce podjętej przez Doktorantkę.

Komentarz, którym został opatrzony cykl publikacji ma typowy układ dla rozpraw doktorskich przedstawianych w formie monografii. Znajdziemy tam: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel badań, hipotezy badawcze, materiały i metody, rezultaty przeprowadzonych badań, dyskusję, podsumowanie i wnioski, literaturę, spis tabel i rycin, pozostałą aktywność naukową, załączniki.

Powyższy sposób prezentacji wyników pracy jest właściwy i spełnia wymagania ustawowe dotyczące przedstawienia osiągnięcia w przewodzie doktorskim.

Ocena merytoryczna pracy

Bakterie *Staphylococcus aureus* należą do oportunistycznych bakterii chorobotwórczych człowieka i zwierząt. Ze względu na specyficzne uwarunkowania genetyczne *S. aureus* jest zarówno komensalem jak i potencjalnym patogenem człowieka, a dodatkowo różnorodne mechanizmy wirulencji takie jak: koagulaza wolna, czynnik CF (clumping factor - koagulaza związana), stafylokinaza, enterotoksyny (białka termostabilne oznaczone od A do X), toksyna wstrząsu toksycznego1 (TSST-1) czynią go groźnym czynnikiem wywołującym incydenty chorobowe u ludzi i zwierząt.

W meta-analizie przygotowanej przez Doktorantkę (P1, *Food Control*) wykazano, że *S.aureus* może być przenoszony w łańcuchu pokarmowym poprzez niepasteryzowane produkty pochodzenia zwierzęcego np. mleka i serów przygotowanych z takiego mleka. A źródłem zanieczyszczenia mogą być zwierzęta, od których pochodzi surowiec lub

człowiek jako czynnik zanieczyszczenia wtórnego poprzez złe warunki higieniczne produkcji. Niemniej wykazano zmniejszającą się tendencję zanieczyszczenia surowego mleka bakteriami *S.aureus* na przestrzeni lat. W latach 2000-2016 33,5% próbek mleka krowiego zanieczyszczonych było *S.aureus,* natomiast wg. przeprowadzonej meta-analizy wynika, że na świecie w czasie ostatnich 10 lat jedynie 29,07% próbek mleka było zanieczyszczonych przez w/w bakterie. W przypadku serów przygotowanych w z mleka niepasteryzowanego, 42,81% prób było dodatnich (w czasie ostatnich 10 lat). Zatem można przypuszczać, że za tak duży odsetek prób dodatnich dla serów przy niskim odsetku mleka niepasteryzowanego z dużym prawdopodobieństwem odpowiada czynnik ludzki i niskie standardy higieniczne procesu produkcji.

Natomiast zaskakujące jest, że nie ma różnicy w zanieczyszczeniu mleka surowego *S.aureus* w krajach wysokorozwiniętych i rozwijających się. Powyższe dane zebrane w meta-analizie pokazują skalę problemu jakim jest stosowanie mleka niepasteryzowanego w produkcji serów czy innych produktów żywnościowych na bazie takiego surowca i możliwość przenoszenia *S.aureus* w tym MRSA i VRSA. Meta-analiza przygotowana została bardzo rzetelnie w oparciu o schemat PRISMA i jest świetnie przygotowanym wprowadzeniem i uzasadnieniem do podjęcia w/w tematyki pracy doktorskiej.

W publikacji P2 omówiono: występowanie, profil oporności na antybiotyki oraz obecność czynników wirulencji szczepów *S.aureus* wyizolowanych z różnych etapów produkcji serów zagrodowych. Spośród 180 prób pobranych na różnym etapie produkcji tych serów w 93 próbach stwierdzono obecność bakterii *S.aureus*. Największy odsetek badanych szczepów (58,1%) wykazywał oporność na benzypenicylinę. Fenotypowy i genotypowy profil antybiotykooporności nie był zaskakujący. Wśród badanych szczepów stwierdzono antybiotykooporność na antybiotyki β-laktamowe i tetracykliny, erytromycynę co jest niewątpliwe związane ze stosowaniem tych antybiotyków w leczeniu zakażeń u bydła. Natomiast 22,6% szczepów *S.aureus* objętych badaniami były to szczepy wielolekooporne, w tym zaledwie 12,9% były to szczepy MRSA i tylko 2 szczepy VRSA co stanowi (2,2%).

Przyglądając się wynikom obecności genów antybiotykooporności w przypadku tetracykliny stwierdzono wysoki odsetek obecności genu *tet*K (63,4%), *tet*M (81,7%) oraz *tet*L (17,2%). Natomiast fenotypowa manifestacja oporności na antybiotyki z tej grupy kształtuje się następująco: dla tetracykliny 20,4% szczepów opornych, tygecyliny 23,7 %. Zatem nasuwają się następujące pytania do dyskusji podczas publicznej obrony:

- Jak wytłumaczyć zaistniałe zjawisko?
- Czy zawsze obecność genów oporności na antybiotyki manifestuje się w fenotypie?
- Czy procesy technologiczne podczas produkcji (nie tylko serów) mogą mieć wpływ na manifestację fenotypową obecności genów oporności na antybiotyki?

W dalszych badaniach przedstawionych w publikacji P2 oceniono zdolność badanych szczepów *S. aureus* do tworzenia biofilmu. Równolegle zbadano również obecność genów odpowiedzialnych za tworzenie tych struktur. Zdolność do tworzenia biofilmu podzielono na trzy kategorie: silny biofilm, umiarkowany biofilm oraz słaby biofilm.

- Jakie kryterium przyjęto przy takim podziale biofilmu?

W przypadku genetycznych determinant odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu określono obecność następujących genów: *ica*DBC, *bap*, *eno*, *sig*B, *sar*A, *agr*D. Stwierdzono, że w przypadku badanych szczepów do najczęściej występujących należał gen *eno*, który jest odpowiedzialny za białko wiążącego lamininę.
Ponadto, Doktorantka stwierdziła obecność korelacji pomiędzy zdolnością szczepów do tworzenia biofilmów a fenotypową opornością na wszystkie testowane antybiotyki.

- Prosiłabym o rozwiniecie i szersze omówienie tego zagadnienia podczas autoreferatu.

Natomiast wszystkie badane szczepy charakteryzowała się obecnością genów kodujących enterotoksyny. Co jest szczególnie ważne ze względu na epidemiologię zatruć pokarmowych powodowanych przez *S.aureus*.

Do dalszych badań wytypowano 16 szczepów *S. aureus*, dla których przeprowadzono sekwencjonowanie genomów. W oparciu o uzyskane wyniki przyporządkowano szczepy do typów sekwencyjnych (ST) (publikacja P3). Stwierdzono, ze najwięcej bo 6 szczepów należy do ST 109, natomiast pozostałe szczepy należały do typów sekwencyjnych ST 130, ST5, ST7, ST97, ST352, ST 398. W pracy wykazano, że wiele genów wirulencji szczepów *S.aureus* było ścisłe powiązane z określonym typem ST. Mianowicie gen *sea* kodujący klasyczną enterotoksynę SEA stwierdzono tylko u jednego szczepu oznaczonego symbolem SA/JG/047 należącego do ST5. Występowanie genów leukocydyn *luk*D i *luk*E stwierdzono u 9 szczepów należących do ST7 i ST109.

W charakterystyce badanych szczepów *S.aureus* zwrócono również uwagę na genetyczne elementy ruchome odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się czynników wirulencji bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. W pracy zwrócono uwagę na wyspy patogenności, obecność profagów oraz plazmidy typu *rep*. Wyspy patogenności, są często oskrzydlone przez sekwencje repetytywne elementy insercyjne ale mogą także zawierać geny o sekwencji podobnej do genu *int*, kodującego fagową integrazę. Stąd ich zdolność do mobilności. W przedstawionej do oceny pracy wśród 16 badanych szczepów *S. aureus* obecność wysp patogenności stwierdzono w 13 przypadkach co stanowi bardzo wysoki odsetek szczepów. A najczęściej występującym typem wysp patogenności był ISSau3. W przypadku plazmidów typu *rep* obecność tych elementów ruchomych stwierdzono tylko dla 3 szczepów. Natomiast obecnością profagów charakteryzowały się wszystkie badane szczepy. Obecność zidentyfikowanych genetycznych elementów ruchomych u badanych szczepów wyizolowanych z serów zagrodowych sprzyja rozprzestrzenianiu w środowisku żywności poprzez horyzontalny transfer genów czynników zjadliwości szczepów i podwyższa ryzyko występowania się zatruć pokarmowych u człowieka.

W kolejnym etapie badań (Publikacja P4) Doktorantka dokonuje wyboru 5 szczepów *S.aureus* i poddaje je stresowi środowiskowemu w obrębie ciśnienia osmotycznego oraz warunków kwasowo-zasadowych. Bada jak czynniki stresowe wpływają na ekspresję

genów enterotoksyn. Jako czynniki stresu środowiskowego wytypowano obecność chlorku sodu w stężeniu 4,5%, stres kwasowo-zasadowy: pH środowiska 9,6 oraz 4,5. Parametry te odpowiadają parametrom stosowanym w przemyśle spożywczym podczas przetwarzania surowców zwierzęcych i roślinnych. Wyznaczano dwa parametry kontroli działania niekorzystnych czynników środowiskowych a mianowicie przeżywalność bakterii *S.aureus* oraz poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę toksyn bakteryjnych.

Zastosowany stres środowiskowy w postaci stężenia 4,5% NaCl oraz pH 9,6 nie był czynnikiem znacząco wpływającym na przeżywalność komórek bakterii *S. aureus.* Liczebność żywych komórek w obu przypadkach wynosiła około 94%. Natomiast stres wywołany przez obniżenie pH do 4,5 spowodował obniżenie liczby żywych komórek bakterii od 67,64% do 83,63% w zależności od badanego szczepu. Uzyskane wyniki nie są zaskakujące ze względu na bardzo dużą elastyczność i tolerancję bakterii *Staphylococcus* spp. na niekorzystne warunki środowiskowe. Przykładowo, tolerancja niektórych szczepów *Staphylococcus* spp. na NaCl może sięgać nawet do stężenia 15% tego czynnika. A rozpiętość tolerancji na stężenie jonów wodorowych w przypadku bakterii *Staphylococcus* spp. może wynosić wartości od pH 4,5 zazwyczaj do 9,5 ale niektórych przypadkach nawet do pH równego 10,0. Oczywiście należy pamiętać, że bardzo często tolerancja na niekorzystne warunki środowiska jest odpowiedzią indywidualną szczepu bakterii.

W przypadku monitorowania wpływu niekorzystnych warunków środowiskowych na ekspresję genów toksyn wytwarzanych przez bakterie *S.aureus* zasadniczo nie stwierdzono globalnie ujmując znaczących różnić. Pojedyncze geny toksyn miały podwyższoną lub obniżoną ekspresję genów. W większości przypadków różnice nie były statystycznie istotne. **Zaobserwowany efekt jest pozytywny, ze względu na fakt, iż przedstawione w pracy warunki symulujące operacje technologiczne podczas procesu produkcji żywności znacząco nie podwyższają potencjału patogennego w obrębie syntezy enterotoksyn szczepów *S. aureus* mogących znaleźć się w surowcu a potem w żywności**. I tak jak Doktorantka stwierdza w dyskusji zamieszczonej w Komentarzu powyższe badania, które są badaniami modelowymi należałoby przenieść do warunków *in situ* do matrycy żywności.

Podsumowaniem pracy jest sformułowanie 6 wniosków, które mają odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach badań.

Praca została przedstawiona jako cykl publikacji. Zastosowana literatura w publikacjach jest aktualna i adekwatnie cytowana. W przypadku Komentarza dołączonego do cyklu publikacji to znajdujemy tam 97 aktualnych pozycji literaturowych głównie anglojęzycznych, zacytowanych w sposób prawidłowy.

Wykorzystywane narzędzia badawcze i statystyczne.

W pracy Doktorantka wykorzystuje nowoczesne narzędzia statystyczne oraz platformy do tworzenia diagramów np. PRISMA, BioNumerics ale również inne do graficznego przedstawiania korelacji i budowania map ciepła.

W pracy mikrobiologa wykorzystuje najnowsze techniki służące do genotypowania, PCR, PCR-REAL TIME, cystometrię przepływową wraz z różnicowaniem żywotności komórek. Niemniej metody te są wspomagane przez metody konwencjonalne stosowane w mikrobiologii (metoda płytkowa oznaczania mikroorganizmów). Metody badawcze i statystyczne zostały dobrane i zastosowane w sposób prawidłowy do realizacji niniejszej pracy.

Wniosek końcowy

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zatytułowana **„Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych" przedstawia w pełni oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz** spełnia wymagania określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2023, poz. 742 z późn. zm).

Założone cele badawcze zostały zrealizowane, a postawione hipotezy pozytywnie zweryfikowane. Przedstawione w pracy wyniki wpisują się nurt zagadnień badawczych prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W oparciu o powyższe przesłanki wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie **o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Gajewskiej i dopuszczenie Jej do dalszych etapów postępowania.**

Wniosek o wyróżnienie

Stwierdzam, że podjęta w dysertacji tematyka i zaproponowane badania są nowatorskie, wnoszą do dyscypliny technologia żywności i żywienia nowe informacje. Przedstawiony cykl publikacji opatrzony wspólnym tytułem „Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych" jest opracowaniem teoretyczno-eksperymentalnym.

Wykonie tak dokładnej i wnikliwej meta-analizy problemu jakim jest rozprzestrzenianie się szczepów *S.aureus* w mleku surowym i ich potencjał wirulentny wymagało od Doktorantki wykonania ogromnej pracy ale przede wszystkim rzeczowej analizy danych, które zebrała. Następnie w oparciu o wyniki analizy zaprojektowała badania eksperymentalne, w których skoncentrowała się na analizie genomu i czynnikach wirulencji szczepów środowiskowych. Wartością dodaną z pewnością jest charakterystyka właśnie szczepów środowiskowych, które mogą „spotykać" się z różnymi czynnikami biotycznymi i abiotycznymi, w wyniku czego mogą ulegać modyfikacjom genetycznym i będą zdecydowanie różne od szczepów korekcyjnych. Uzyskane w ten sposób wyniki rzucają zdecydowanie więcej światła na wirulencję szczepów *S.aureus,* niż wyniki uzyskiwane nadal przez wiele zespołów badawczych na szczepach korekcyjnych.

Ponadto dysertacja została przygotowana jako cykl publikacji opublikowanych bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy JCR. Wykorzystane metody badawcze - najnowszej generacji jak i klasyczne wymagały od doktorantki dużej wiedzy teoretycznej jak i praktycznej oraz pokazują doskonały warsztat Kandydatki do stopnia doktora.

W związku z powyższymi przesłankami wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o wyróżnienie przedłożonej przez Panią mgr inż. Joannę Gajewską rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Antybiotykooporność oraz wirulencja szczepów *S. aureus* wyizolowanych z łańcucha produkcji polskich serów zagrodowych".